

4/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

007409778

WPI Acc No: 1988-043713/198807

XRAM Acc No: C88-019486

Biopolymers affinity chromatography sepn. and purificn. - using affinity
ligands covalently bound to the surface of porous silica gel

Patent Assignee: DIAGEN INST MOLEKUL (DIAG-N)

Inventor: COLPAN M

Number of Countries: 012 Number of Patents: 004

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 3627063	A	19880211	DE 3627063	A	19860809	198807 B
EP 263934	A	19880420	EP 87111312	A	19870805	198816
JP 63072699	A	19880402	JP 87197991	A	19870807	198819
DE 3627063	C	19910829				199135

Priority Applications (No Type Date): DE 3627063 A 19860809

Cited Patents: FR 2403098; FR 2403556; US 4415665; WO 8303363

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 3627063	A		5		
EP 263934	A	E			

Designated States (Regional): AT BE CH DE FR GB IT LI LU NL SE

Abstract (Basic): DE 3627063 A

Process for the sepn. and purificn. pf biopolymers by affinity chromatography comprises using porous silica gel to the surface of which affinity ligands are covalently baind, where silica gels are used with defined, narrow pore-size ranges which are 5 to 20 times the size of the material to be purified. Pref. affinity ligands are antibodies. The pore size of the silica gel is generally at least 300 Angstroms, the pref. pore-size range being 500-10000 Angstrom.

USE/ADVANTAGE - Purificn. of biopolymers e.g. protein, glycoprotein, nucleic acids, viruses, vaccines, allorganelles, prokaryotci or cukariotic cells, micelles or vesicles, e.g. chylomicrons, lipoproteins and protein complexes, especially those of a min. size or 50-100 Angstrom up to a max. of 5000 Angstrom or more.

Rapid reliable and highly specific purifcn. process

Title Terms: BIO; POLYMER; AFFINITY; CHROMATOGRAPHY; SEPARATE; PURIFICATION
; AFFINITY; LIGAND; COVALENT; BOUND; SURFACE; POROUS; SILICA; GEL

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Additional): A61K-039/00; B01D-015/08;

B01J-020/10; C07K-003/20

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B02-V02; B04-B01B; B04-B02B4; B04-B04A1; B04-B04A3;

B04-B04A6; B11-B; D05-H13

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M421 M423 M720 M903 N161 N164 Q233 V270 V273 V275 V280 V500 V560
V600 V613 V752 V753 V754 V802 V810 V814 V818

03 M423 M430 M782 M903 N161 N164 Q233 Q508 V600 V611

Chemical Fragment Codes (M2):

02 B114 B701 B712 B720 B831 C101 C108 C800 C802 C804 C805 C807 M411
M430 M782 M903 M910 N161 N164 Q233 Q508

Derwent Registry Numbers: 1542-U

?

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Patentschrift
10 DE 36 27 063 C 2

51 Int. Cl. 5:
B 01 D 15/08
C 07 K 3/20
B 01 J 20/10

21 Aktenzeichen: P 36 27 063.6-41
22 Anmeldetag: 9. 8. 86
43 Offenlegungstag: 11. 2. 88
45 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 29. 8. 91

(4)

DE 36 27 063 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

73 Patentinhaber:

Diagen Institut für molekularbiologische Diagnostik
GmbH, 4000 Düsseldorf, DE

74 Vertreter:

Schönwald, K., Dr.-Ing.; von Kreisler, A.,
Dipl.-Chem.; Fues, J., Dipl.-Chem. Dr.rer.nat.; Keller,
J., Dipl.-Chem.; Selting, G., Dipl.-Ing.; Werner, H.,
Dipl.-Chem. Dr.rer.nat., Pat.-Anwälte, 5000 Köln

72 Erfinder:

Colpan, Metin, Dr., 4006 Erkrath, DE

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

DE-OS 32 11 309
FR 24 03 556 A
RÖMPP: Chemie-Lexikon, 8. Aufl., 1979, S. 83-84;

54 Verfahren zur Abtrennung und Reinigung von Biopolymeren durch Affinitätschromatographie

DE 36 27 063 C 2

Beschreibung

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur Abtrennung und Reinigung von Biopolymeren durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von porösem Silicagel und daran oberflächlich kovalent gebundenen Affinitätsliganden.

Für die Affinitätschromatographie werden in erster Linie poröse Träger wie Dextrane, Agarosen, Acrylamid etc. eingesetzt, die Porengrößenverteilungen zwischen 200 und 1000 Å aufweisen. An diese Materialien sind beispielsweise kovalent Antikörper gebunden. Mit derartigen Materialien ist es möglich, Proteine wie Insulin, Interferone etc. im industriellen Maßstab zu reinigen.

In der US-PS 44 15 665 ist eine spezielle Methode zur kovalenten Bindung von biologisch aktiven organischen Substanzen an polymere Träger beschrieben, zu denen unter anderem Agarose, Cellulose und Kieselsäuregel zählen. Verwendet wurde in den Beispielen 4 und 5 ein poröses Silicagel unbestimmter Porengröße und unbestimmter Korngröße. Kovalent gebunden wurde N⁶-(6-Aminoethyl)-Adenosin-5'-Monophosphat. Dieses Material ist jedoch nicht für die Affinitätschromatographie geeignet.

Die DE-OS 32 11 309 betrifft ein Verfahren zur Abtrennung und Reinigung von Biopolymeren mittels Ionenaustauschchromatographie. Dabei wird poröses Kieselsäuregel verwendet, an dessen Oberfläche eine ionische Gruppe gebunden ist. Dieses Material eignet sich hervorragend zur Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen. Charakteristisch für dieses Material ist, daß definierte enge Porengrößenbereiche verwendet werden, welche das 1- bis 20fache der zu trennenden Nukleinsäuren oder Proteine besitzt.

Die FR-A 24 03 556 offenbart chromatographische Trennmateriale, bei denen Antikörper auf poröser Kieselsäure adsorbiert werden und dann untereinander vernetzt werden. Die Liganden umschließen somit die Kieselsäurepartikel. Eine kovalente Bindung der Affinitätsliganden an das Trennmateriale ist mithin nicht gewährleistet.

Die Erfindung hat sich die Aufgabe gestellt, das Verfahren zur Abtrennung und Reinigung von Biopolymeren durch Affinitätschromatographie mit Hilfe von porösem Kieselsäuregel und daran oberflächlich kovalent gebundenen Affinitätsliganden zu verbessern, so daß hiermit eine rasche, zuverlässige und hochspezifische Abtrennung und Reinigung von Biopolymeren möglich ist.

Dabei soll einerseits der meistens sehr teure Affinitätsligand, wie zum Beispiel Antikörper, optimal ausgenutzt werden, zum anderen auch die Menge des Trägermaterials so klein wie möglich gehalten werden, um unnötige Verluste und Verdünnungen zu vermeiden. Intensive Untersuchungen verschiedener poröser Träger, verschiedener Affinitätsliganden und verschiedener durch die Affinitätschromatographie zu reinigender Biopolymere haben zu dem überraschenden Ergebnis geführt, daß die oben genannte Aufgabe optimal dadurch gelöst werden kann, daß poröses Kieselsäuregel mit definierten engen Porengrößenbereichen verwendet wird, welche jeweils das 5- bis 20fache der Größe des zu reinigenden Materials aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß die Biopolymere durch Affinitätschromatographie an oberflächlich über Kupplungsreaktionen kovalent an das Kieselsäuregel gebundenen Antikörpern oder anderen mehr oder weniger großen

Substanzen, wie Protein A, mit spezifischer Affinität zu den zu reinigenden Biopolymeren als Affinitätsliganden, abgetrennt und gereinigt werden.

Werden Kieselsäuregele verwendet mit undefinierten und breiten Porengrößenbereichen, kann keines der oben genannten Ziele optimal gelöst werden. Werden Kieselsäuregele mit definierten engen Porengrößenbereichen eingesetzt, welche zwar größer sind als das zu reinigende Material, jedoch kleiner als das fünffache der Größe des zu reinigenden Materials, werden die teuren und wertvollen Affinitätsliganden nur unvollständig ausgenutzt. Außerdem wächst bei kleineren Porengrößenbereichen bereits die Menge an ausgebluteten Affinitätsliganden bzw. verunreinigenden Fragmenten derselben. Werden Kieselsäuregele eingesetzt mit Porengrößenbereichen, die größer sind als das zwanzigfache der Größe des zu reinigenden Materials, so sinkt die Oberfläche des Materials in so erheblichem Maße, daß unnötig große Mengen Kieselsäuregel eingesetzt werden müssen und ein unnötig großes Volumen von Elutionsflüssigkeit eingesetzt werden muß, um die ursprünglich gebundenen Biopolymeren wieder aus dem Material auszuwaschen.

Dies ist insbesondere bei therapeutisch einzusetzenden Biopolymeren außerordentlich unerwünscht.

Innerhalb des erfindungsgemäßen Bereiches vom fünf- bis zwanzigfachen der Größe des zu reinigenden Materials ist der untere Bereich bevorzugt für praktisch kugelförmige Biopolymere und der obere Bereich für langgestreckte und sperrige Biopolymere.

Weiterhin ist der untere Porengrößenbereich bevorzugt, wenn relativ kleine Affinitätsliganden mit relativ kurzen Spacern an die Oberfläche des Kieselsäuregels gebunden sind, während der obere Porengrößenbereich bevorzugt ist, wenn größere und sperrige Affinitätsliganden und/oder längerkettige Spacer zur Bindung der Affinitätsliganden an die Oberfläche des Kieselsäuregels zum Einsatz kommen.

Als oberflächlich kovalent gebundene Affinitätsliganden kommen in erster Linie Antikörper in Frage, jedoch auch andere mehr oder weniger große Substanzen mit spezifischer Affinität zu dem zu reinigenden Biopolymeren. Ein typisches Beispiel hierfür ist das Protein A aus *Staphylococcus aureus* oder rekombinantes Protein A, welches eine spezifische Affinität zu Immunglobulinen (IgG) aufweist.

Besonders bedeutungsvoll ist das erfindungsgemäße Verfahren für die Abtrennung und Reinigung von Proteinen, Glykoproteinen und/oder Nukleinsäuren, von Viren oder Vaccinen, von Zellorganellen, prokaryontischen oder eukaryontischen Zellen, Micellen oder Vesikeln, von Chylomikronen, VLDL- (very low density), LDL- (low density) und HDL- (high density) Lipoproteinen sowie Proteinkomplexen.

Es handelt sich somit insbesondere um Biopolymere mit Größen von mindestens 5 bis 10 nm bis hinaus zu Biopolymeren mit Größen von 500 und mehr nm. Erfindungsgemäß werden somit poröse Silicagele eingesetzt mit definierten engen Porengrößenbereichen von mindestens 30 nm, vorzugsweise jedoch zwischen 50 und 1000 nm. Prinzipiell könnten auch Kieselsäuregele mit noch größeren Porengrößen eingesetzt werden, jedoch ist es bisher technisch schwierig, Kieselsäuregele mit engen Porengrößenbereichen dieser Größenordnung herzustellen.

Einige typische Anwendungsgebiete für das erfindungsgemäße Verfahren sind im folgenden zusammengestellt:

Viren und Vaccine zur Impfstoffherstellung
 – Lebend-Vaccine (Pockenviren, Ø ca. 250 nm)
 – attenuierte Virusstämme (Maul- und Klauenseuche-Viren, Ø ca. 250 nm)
 – recombinante Vaccine hergestellt durch gentechnologische Expressionsverfahren aus höheren Zellkulturen oder Bakterien (z. B. Hepatis B-Virus Hüllproteinkomplexe, Ø ca. 50 nm)
 – Vaccine auf der Basis von Vesikeln und Micellen (Ø ca. 10–50 nm).

Organellen

- Mitochondrien (Ø ca. 500 nm)
- Microbodies

Pro- und eukaryotische Zellen

- z. B. Entfernung von Mykoplasmen (Ø ca. 100 nm) und Tumorzellen (Ø ca. 10 000 nm) aus Medien oder Blut

Proteine

- kleine Proteine: Lymphokine wie z. B. Interferon und TNF (MW 10 000–20 000)
- mittlere Proteine: gewebspezifische Plasminogenaktivatoren (MW ca. 65 000) IgG (MW 150 000, Ø ca. 15 nm) Urokinase (Ø ca. 9 nm)
- große Proteine: IgM (MW ca. 900 000 nm, Ø ca. 90 nm) Blutfaktoren wie z. B. Faktor VIII (MW > 1 Mio., Ø > 50 nm)

Proteinkomplexe

- Entfernung von Immunkomplexen wie Rheumafaktoren (MW 500 000, Ø ca. > 50 nm) durch Blutwäsche
- Enzymkomplexe wie Fettsäuresynthetase (MW ca. 2,3 Mio.)
- filamentöse Komplexe wie Microtubulin, Actin-komplexe
- Ribosomen

Micellen und Vesikel

- Chylomikronen (Ø ca. 100–1000 nm)
- VLDL (very low density lipoproteins), Ø ca. 30–50 nm
- LDL (Ø ca. 20–25 nm)
- HDL (Ø > 10 nm)

Die kovalente Bindung der Affinitätsliganden an die Oberfläche der Poren des Kiesel säuregels erfolgt in an sich bekannter Weise, beispielsweise durch Umsetzung eines Silans, welches durch anschließende Reaktionen am organischen Rest aktiviert werden kann zur Umsetzung mit den Affinitätsliganden.

Eine besonders schonende und deshalb bevorzugte Aktivierung besteht im Aufbau von Alkyl- bzw. Arylsulfonsäureestern. Da diese in besonders schonender Weise mit Aminogruppen, Hydroxylgruppen und Sulfhydrylgruppen der Affinitätsliganden reagieren und diese dadurch schonend kovalent an das Kiesel säuregel binden. Prinzipiell sind aber auch alle anderen bekannten Kupplungsreagenzien geeignet, sofern diese nicht zu einer elektrischen Aufladung des Affinitätsliganden oder einer sonstigen, die Affinität beeinflussenden Denaturierung führen. Prinzipiell können sowohl kürzere als auch längere Spacer zwischen Kiesel säuregel und den Affinitätsliganden eingebaut werden. Besonders bevorzugt sind jedoch solche mit nur 2 bis 5 Kohlenstoffatomen. Kürzere Spacer können zu einer unnötigen steri-

schon Behinderung der Reaktion zwischen Affinitätsliganden und zu reinigenden Biopolymeren führen. Längere Spacer führen zu einer unnötigen Vergeudung des innerhalb der Poren zur Verfügung stehenden freien Raumes, ohne den Wirkungsgrad der Affinitätsliganden zu erhöhen.

In den nachfolgenden Bezugsbeispielen ist die Herstellung von einigen Kiesel säuregelen beschrieben, die oberflächlich so aktiviert sind, daß sie verschiedene Affinitätsliganden schonend kovalent binden können. In den anschließenden Beispielen ist beschrieben, wie spezielle Affinitätsliganden oberflächlich kovalent gebunden werden und die so entstandenen porösen Kiesel säuregele zur effizienten Affinitätschromatographie der entsprechenden Biopolymeren eingesetzt werden können.

Bezugsbeispiel 1

Synthese von Diol-Kiesel säuregel

50 g poröses Kiesel säuregel mit einer Porengröße von 100 nm und einer Partikelgröße von ca. 60 µm werden in einem 500 ml Dreihalskolben bei einem Druck von < 1 mbar 12 Stunden bei einer Temperatur von 150°C getrocknet und aktiviert. Nach dem Abkühlen wird belüftet und mit 50 ml destilliertem γ-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan in 200 ml absolutem Toluol und 1 ml absolutem Tributylamin versetzt. Die Umsetzung erfolgt 12 Stunden bei 111°C, der Rückflußtemperatur von Toluol. Nach der Reaktion wird das Produkt Epoxy-Kiesel säuregel abgesaugt und zweimal mit 250 ml Toluol, dreimal mit 250 ml Aceton und zweimal mit 0,005 M HCl gewaschen und abgesaugt. Das Epoxy-Kiesel säuregel wird in 250 ml 0,005 M HCl suspendiert und in 2 Stunden bei 90°C die Epoxy-Gruppe zur Diol-Gruppe gespalten.

Das Produkt Diol-Kiesel säuregel wird abgesaugt, fünfmal mit H₂O und zweimal mit Aceton gewaschen und bei 50°C getrocknet.

Bezugsbeispiel 2

Aktivierung von Diol-Kiesel säuregel mit Tosylchlorid

50 g trockenes Diol-Kiesel säuregel mit 100 nm Porengröße, synthetisiert nach Bezugsbeispiel 1, wird in einem 500-ml-Drehalskolben bei einem Druck von < 1 mbar 2 Stunden bei 70°C getrocknet, um eventuell vorhandene Feuchtigkeit zu entfernen. Nach der Trocknung wird belüftet und mit 250 ml absolutem Aceton und 1 ml absolutem Pyridin versetzt, die Suspension im Vakuum entgast und an einen Rührer angeschlossen. Zu dieser Suspension werden 10 mmol Tosylchlorid, gelöst in 50 ml absolutem Aceton, unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Nach der Reaktion bei Raumtemperatur 20 bis 24°C für 30 Minuten wird das Tosyl-aktivierte Kiesel säuregel abgesaugt und mit Aceton, Aceton : 2 mM HCl der Zusammensetzungen 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 gewaschen und abschließend mit 1 mM HCl gewaschen, abgesaugt und gefriergetrocknet.

Bezugsbeispiel 3

Aktivierung von Diol-Kiesel säuregel mit Trichlormethansulfonsäurechlorid

50 g trockenes Diol-Kiesel säuregel mit 250 nm Porengröße, synthetisiert nach Bezugsbeispiel 1, wird in

einem 500-ml-Dreihalskolben bei einem Druck von < 1 mbar 2 Stunden bei 70°C getrocknet, um eventuell vorhandene Feuchtigkeit zu entfernen. Nach der Trocknung wird belüftet und mit 250 ml absolutem Aceton und 1 ml absolutem Pyridin versetzt und an einen Rührer angeschlossen. Die Suspension wird unter Vakuum entgast und mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Zu dieser Suspension werden 10 mmol Trichlormethansulfonsäurechlorid, gelöst in 50 ml absolutem Aceton, unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Nach der Reaktion bei 0°C für 30 Minuten wird das Trichlormethansulfonsäurechlorid-aktivierte Kieselsäuregel abgesaugt und mit Aceton, Aceton : 2 mM HCl der Zusammensetzungen 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 gewaschen und abschließend mit 1 mM HCl gewaschen und gefriergetrocknet.

Bezugsbeispiel 4

Aktivierung von Dio-Kieselsäuregel mit 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäurechlorid

50 g trockenes Diol-Kieselsäuregel mit 500 nm Porengröße, synthetisiert nach Bezugsbeispiel 1, wird in einem 500-ml-Dreihalskolben bei einem Druck von < 1 mbar 2 Stunden bei 70°C getrocknet, um eventuell vorhandene Feuchtigkeit zu entfernen.

Nach der Trocknung wird belüftet und mit 250 ml absolutem Aceton und 1 ml absolutem Pyridin versetzt und an einen Rührer angeschlossen. Die Suspension wird unter Vakuum entgast und mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Zu dieser Suspension werden 10 mmol 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäurechlorid, gelöst in 50 ml absolutem Aceton, unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Nach der Reaktion bei 0°C für 30 Minuten wird das 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäurechlorid-aktivierte Kieselsäuregel abgesaugt und mit Aceton, Aceton : 2 mM HCl der Zusammensetzungen 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 gewaschen und abschließend mit 1 mM HCl gewaschen und gefriergetrocknet.

Bezugsbeispiel 5

Aktivierung von Diol-Kieselsäuregel mit 2,2,2-Trifluorethansulfonsäurechlorid (Tresylchlorid)

50 g trockenes Diol-Kieselsäuregel mit 1000 nm Porengröße, synthetisiert nach Bezugsbeispiel 1, wird in einem 500-ml-Dreihalskolben bei einem Druck von < 1 mbar 2 Stunden bei 70°C getrocknet, um eventuell vorhandene Feuchtigkeit zu entfernen. Nach der Trocknung wird belüftet und mit 250 ml absolutem Aceton und 1 ml absolutem Pyridin versetzt und an einen Rührer angeschlossen. Die Suspension wird unter Vakuum entgast und mit einem Eisbad auf 0°C gekühlt. Zu dieser Suspension werden 10 mmol Tresylchlorid unter ständigem Rühren langsam zugetropft. Nach der Reaktion bei 0°C für 30 Minuten wird das Tresylchlorid-aktivierte Kieselsäuregel abgesaugt und mit Aceton, Aceton : 2 mM HCl der Zusammensetzungen 75 : 25, 50 : 50, 25 : 75 gewaschen und abschließend mit 1 mM HCl gewaschen und gefriergetrocknet.

Beispiel 1

Reinigung von Human-Immunglobulinen (IgG) mit Protein A-Affinitätschromatographie

A: 10 g Sulfonylechlorid aktiviertes Kieselsäuregel mit

einer Porengröße von 100 nm werden in 50 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, suspendiert und im Vakuum entgast. Zu dieser Suspension werden 300 mg Protein A (aus *Staphylococcus aureus* oder recombinantes Protein A) gelöst in 15 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, zugegeben. Die Suspension wird 6 Stunden bei 4°C geschüttelt, um eine hohe Immobilisierung von Protein A zu gewährleisten. Nach der Reaktion wird das Produkt Protein A-Kieselsäuregel abfiltriert, in 100 ml 0,1 M Mercaptoethanol, 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 8,0, suspendiert und 2 Stunden geschüttelt, um nicht abreagierete Sulfonylegruppen zu blockieren. Nach der Blockierungsreaktion wird das Produkt fünfmal mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen.

B: 10 g Protein A-Kieselsäuregel-100 nm (100 nm) werden in eine 1,27 cm × 15 cm Chromatographiesäule mit Einlaß- und Auslaßadapter gepackt und zweimal mit 3 Säulenvolumina 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, und 2 Säulenvolumina 0,05 M Na-Citratpuffer, pH 3,0, gewaschen und 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, äquilibriert. Die IgG-Probe, bestehend aus 1000 mg rohem Human-IgG, wurde in 100 ml 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, gelöst und mit einer Flußgeschwindigkeit von 10 ml/min auf die Säule adsorbiert. Verunreinigungen mit anderen Proteinen und unspezifisch gebundenes IgG werden mit 2 Säulenvolumina 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, ausgewaschen und das spezifisch gebundene Human-IgG mit 0,05 M Citratpuffer, pH 3,0, und einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert.

Die Bindekapazität von Protein A-Kieselsäuregel (Porengröße 100 nm) wurde zu 25 mg IgG/ml Säulenvolumen bestimmt.

Beispiel 2

Reinigung von Human-Immunglobulinen (IgG) mit Anti-Human-IgG Antikörpern durch Affinitätschromatographie

A: 200 mg Anti-Human-IgG Antikörper werden analog Beispiel 1A an 10 g Sulfonyle aktiviertes Kieselsäuregel mit einer Porengröße von 250 nm immobilisiert.

B: Entsprechend Beispiel 1 B wird das Anti-Human-IgG Kieselsäuregel-2500 in eine Chromatographiesäule gepackt und äquilibriert. Nach der Bindung von rohem Human-IgG werden die unspezifisch gebundenen Proteine mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, ausgewaschen und das spezifisch gebundene Human-IgG mit 0,05 M Citratpuffer, pH 3,0, und einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Die Bindekapazität von Anti-Human-IgG Kieselsäuregel (Porengröße 250 nm) wurde zu 10 mg Human IgG/ml Säulenvolumen bestimmt.

Beispiel 3

Reinigung von human IgM mit Maus Anti-human-IgM Antikörper Affinitätschromatographie

A: 10 mg Anti-human-IgM Antikörper werden analog Beispiel 1 an 10 g Sulfonyle aktiviertes Kieselsäuregel mit einer Porengröße von 1000 nm immobilisiert.

B: Entsprechend Beispiel 1 B wird das Anti-human-IgM Antikörper-Kieselsäuregel-1000 in eine Chromatographiesäule gepackt und äquilibriert.

Nach der Bindung von rohem Human-IgM werden die unspezifisch gebundenen Proteine mit 0,1 M Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, ausgewaschen und das spezifisch gebundene Human-IgM mit 0,05 M Citratpuffer,

pH 3,0, und einer Flußgeschwindigkeit von 1 ml/min eluiert. Die Bindekapazität von Maus Anti-Human-IgM Kieselsäuregel (Porengröße 1000 nm) wurde zu 0,75 mg IgM/ml Säulenvolumen bestimmt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Abtrennung und Reinigung von Biopolymeren mit Hilfe von porösem Kieselsäuregel mit definierten engen Porengrößenbereichen, welche jeweils das fünf- bis zwanzigfache der Größe des zu reinigenden Materials aufweisen, dadurch gekennzeichnet, daß die Biopolymere durch Affinitätschromatographie an oberflächlich über Kupplungsreagenzien kovalent an das Kieselsäuregel gebundenen Antikörpern oder anderen mehr oder weniger großen Substanzen, wie Protein A, mit spezifischer Affinität zu den zu reinigenden Biopolymeren als Affinitätsliganden, abgetrennt und gereinigt werden.
2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß Kieselsäuregel verwendet werden mit definierten engen Porengrößen im Bereich von 50 bis 1000 nm.
3. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zu reinigende Material Proteine, Glykoproteine und/oder Nukleinsäuren sind.
4. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zu reinigende Material Viren oder Vaccine sind.
5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zu reinigende Material Zellorganellen sind.
6. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zu reinigende Material prokaryotische oder eukaryotische Zellen sind.
7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 und/oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das zu reinigende Material Micellen, Vesikel, Chylomikronen, VLDL-, LDL- und/oder HDL-Lipoproteine sind.
8. Verwendung von porösem Kieselsäuregel mit definierten engen Porengrößenbereichen, welche jeweils das fünf- bis zwanzigfache der Größe des zu reinigenden Materials aufweisen mit oberflächlich durch Kupplungsreagenzien kovalent gebundenen Antikörpern oder anderen mehr oder weniger großen Substanzen, wie Protein A, mit spezifischer Affinität zu den zu reinigenden Biopolymeren als Affinitätsliganden, zur Trennung und Reinigung von Biopolymeren.

